

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2001-218587

(43)Date of publication of application : 14.08.2001

---

(51)Int.Cl.	C12N 15/09
	C12N 1/00
	C12N 5/10
	C12N 7/00
	C12N 9/02
	//(C12N 15/09
	C12R 1:92 )
	(C12N 1/00
	C12R 1:92 )
	(C12N 5/10
	C12R 1:91 )
	(C12N 9/02
	C12R 1:91 )

---

(21)Application number : 2000-035693 (71)Applicant : ACADEMIA SINICA

(22)Date of filing : 08.02.2000 (72)Inventor : CHAO YUU-CHAN

---

### (54) BACULOVIRUS CONTAINING MINIMAL CMV PROMOTER

#### (57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To drive the expression of a glycoprotein in a baculovirus in an early stage.

SOLUTION: A baculovirus is provided containing a genomic DNA molecule containing a CMV promoter sequence and a sequence encoding an RNA, wherein the expression of the RNA is driven by the CMV promoter sequence, wherein the CMV promoter sequence contains sequence 1 in the specification or a functionally equivalent one.

---

### LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 17.01.2001

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's  
decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's  
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-218587

(P2001-218587A)

(43) 公開日 平成13年8月14日 (2001.8.14)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	キーワード* (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 1/00	U 4 B 0 2 4
1/00		7/00	4 B 0 5 0
5/10		9/02	4 B 0 6 5
7/00		C 1 2 R 1: 92)	
9/02		(C 1 2 N 1/00	
審査請求 有 請求項の数28 O L 外国語出願 (全 24 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2000-35693(P2000-35693)

(22) 出願日 平成12年2月8日 (2000.2.8)

特許法第30条第1項適用申請有り

(71) 出願人 596118493

アカデミア・シニカ

ACADEMIA SINICA

台湾タイペイ、ナンカン、イェン・チュ

ー・ユアン・ロード、セクション2、128

番

(72) 発明者 チャオ ユーチャン

台湾、タイペイ、ナンカン、イアン・ジウ

ー ユエン ロード、セクション 2、レ

ー 61、アレー 3、ナンバー 18、4

エフ

(74) 代理人 100077517

弁理士 石田 敬 (外4名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 最小CMVプロモーターを含むバキュロウイルス

(57) 【要約】

【課題】 バキュロウイルスにおいて早期にグリコプロ  
テインの発現を駆動すること。

【解決手段】 CMVプロモーター配列と、RNAをコ  
ードする配列と、を含むゲノムDNA分子を含むバキュ  
ロウイルスであって、該RNAの発現は、CMVプロモ  
ーター配列により駆動され、ここで該CMVプロモータ  
ー配列は配列番号：1又はその機能的等価物を含むこと  
を特徴とするバキュロウイルスを供する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 CMVプロモーター配列と、RNAをコードする配列と、を含むゲノムDNA分子を含むバキュロウイルスであって、該RNAの発現は、CMVプロモーター配列により駆動され、ここで該CMVプロモーター配列は配列番号：1又はその機能的等価物を含むことを特徴とするバキュロウイルス。

【請求項2】 前記CMVプロモーター配列が配列番号：1の配列であることを特徴とする請求項1に記載のバキュロウイルス。

【請求項3】 前記RNAが非バキュロウイルスRNAであることを特徴とする請求項2に記載のバキュロウイルス。

【請求項4】 前記RNAが非バキュロウイルスタンパク質をコードするmRNAであることを特徴とする請求項3に記載のバキュロウイルス。

【請求項5】 前記タンパク質が検出可能であることを特徴とする請求項4に記載のバキュロウイルス。

【請求項6】 前記タンパク質がルシフェラーゼであることを特徴とする請求項5に記載のバキュロウイルス。

【請求項7】 前記RNAが非バキュロウイルスRNAであることを特徴とする請求項1に記載のバキュロウイルス。

【請求項8】 前記RNAが非バキュロウイルスタンパク質をコードするmRNAであることを特徴とする請求項7に記載のバキュロウイルス。

【請求項9】 前記タンパク質が検出可能であることを特徴とする請求項8に記載のバキュロウイルス。

【請求項10】 前記タンパク質がルシフェラーゼであることを特徴とする請求項9に記載のバキュロウイルス。

【請求項11】 前記RNAが非バキュロウイルスタンパク質をコードするmRNAであることを特徴とする請求項1に記載のバキュロウイルス。

【請求項12】 前記タンパク質が検出可能であることを特徴とする請求項11に記載のバキュロウイルス。

【請求項13】 前記タンパク質がルシフェラーゼであることを特徴とする請求項12に記載のバキュロウイルス。

【請求項14】 昆虫細胞においてRNAを発現させる方法であって、該昆虫細胞に請求項1に記載のバキュロウイルスを感染させることを含む方法。

【請求項15】 昆虫細胞において非バキュロウイルスタンパク質を発現させる方法であって、該昆虫細胞に請求項2に記載のバキュロウイルスを感染させることを含む方法。

【請求項16】 昆虫細胞においてRNAを発現させる方法であって、該昆虫細胞に請求項3に記載のバキュロウイルスを感染させることを含む方法。

【請求項17】 昆虫細胞において非バキュロウイルス

タンパク質を発現させる方法であって、該昆虫細胞に請求項4に記載のバキュロウイルスを感染させることを含む方法。

【請求項18】 昆虫細胞においてRNAを発現させる方法であって、該昆虫細胞に請求項6に記載のバキュロウイルスを感染させることを含む方法。

【請求項19】 昆虫細胞において非バキュロウイルスタンパク質を発現させる方法であって、該昆虫細胞に請求項7に記載のバキュロウイルスを感染させることを含む方法。

【請求項20】 昆虫細胞においてRNAを発現させる方法であって、該昆虫細胞に請求項11に記載のバキュロウイルスを感染させることを含む方法。

【請求項21】 配列番号：1記載の配列又はその機能的等価物を含むCMVプロモーター配列を含むプラスミド。

【請求項22】 前記CMVプロモーター配列が配列番号：1記載の配列であることを特徴とする請求項21に記載のプラスミド。

【請求項23】 タンパク質をコードする配列であって該配列の発現が前記CMVプロモーターによって増強することができる配列を更に含む請求項21に記載のプラスミド。

【請求項24】 前記タンパク質がルシフェラーゼであることを特徴とする請求項21に記載のプラスミド。

【請求項25】 細胞内でタンパク質を発現させる方法であって、該細胞を、請求項21に記載のプラスミドで形質転換することを含む方法。

【請求項26】 細胞内でタンパク質を発現させる方法であって、該細胞を、請求項22に記載のプラスミドで形質転換することを含む方法。

【請求項27】 前記細胞が昆虫細胞であることを特徴とする請求項25又は26に記載の方法。

【請求項28】 前記タンパク質がルシフェラーゼであることを特徴とする請求項25又は26に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【従来の技術】バキュロウイルスは鱗翅目（レピドプテラ（*Lepidoptera*））の昆虫に主に感染するDNAウイルスのファミリーであるバキュロウイルスゲノムは一般に約80～230kbの長さの二本鎖DNA分子である。バキュロウイルスは、両方ともウイルス生活環の後期段階の間、強力に活性である内因性ポリヒドリン及びp10プロモーターにより駆動される大量の非バキュロウイルスタンパク質を発現することができる。

【0002】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、特定のタンパク質のためには、バキュロウイルス生活環の早期の発現が適当で好まれる場合がある。例えば、ウイルス生活環の後期では翻訳後グリコシル化が少くともいくら

かは害されるので、ウイルス生活環の早期のグリコプロテインの発現を駆動することが要求され得る。

【0003】

【課題を解決するための手段】本発明は、最小のサイトメガロウイルス（CMV）即時-早期プロモーターがバキュロウイルスベクターの遺伝子の発現を効率よく駆動することができるという発見に基づく。CMVプロモーターはウイルス生活環を通じて制御されないで、この発見は、ウイルス生活環の早期及び後期においてRNA又はタンパク質を高レベルで発現することができるバキュロウイルスベクターの作製を許容する。

【0004】従って、本発明は、CMVプロモーター配列及びRNA（例えば非バキュロウイルスRNA）をコ

ードする配列を含むゲノムを有するバキュロウイルスを特徴とする。RNA（例えば非バキュロウイルスタンパク質をコードするmRNA）の発現は最小CMVプロモーター配列（例えば配列番号：1）により駆動される。最小CMVプロモーター配列の例には、全長のCMVプロモーター配列内にはしばしば含まれるが最小CMVプロモーター配列には存在しない上流配列である配列番号：2の配列を含まないものがある。これらの配列を以下に示す。

【0005】CMV最小プロモーター配列：

【0006】

【化1】

```
taggcgtgtacgggtgggaggtctatataagcagagctcgtttagtgaaccgtcagatcac  
tagaagctttattgcggtagtttatcacagttaaattgctaaccgcagtcag
```

（配列番号：1）

【0007】全長CMVプロモーターから削除される配列：

【0008】

【化2】

```
tcaatattggccattagccatattattcattgggttatatagcataaatcaatattggcta  
ttggccattgcatacgttgatctatatcataatgtacatttatattgggtcatgtcc  
aatatgaccgcatgttggcattgattattgactagttattaatagtaaatcaattacggg  
gtcattagttcatagcccatatatggaggttccgcgttacataaactacggtaaatggccc  
gcctggctgaccgccaacgaccccgccattgacgtcaataatgacgtatgttcccat  
agtaacgccaatagggaactttccattgacgtcaatgggtggagttttacggtaaatgc  
ccacttggcagtagcatcaagtgtatcatatgccaaagtccgccccctattgacgtcaatga  
cggtaaatggcccgccctggcattatgccagtagcatgaccttacgggaactttcctacttg  
gcagtagcatctacgtattagtcacgtattaccatgggtgatgcgggttttggcagtagac  
caatgggcgtggatagcgggtttgactcacggggatttccaagtctccaccccatgacgt  
caatgggagtttgttttggcaccataaatcaacgggactttccaaatgtcgtataaacc  
cgccccgttgacgcaaatgggcccgcg （配列番号：2）
```

【0009】天然のCMVゲノムにおいて、CMV最小プロモーター配列（配列番号：1）は全長CMVプロモーター配列から削除された配列（配列番号：2）のすぐ下流にある。CMVプロモーター配列が配列番号：2の配列を含まないと言う場合、それは、プロモーター配列が配列番号：2の完全なヌクレオチド配列を含まないことを意味する。これにより、プロモーター配列は配列番号：2の配列のフラグメントを含んでもよく、なお配列番号：2の配列を含まないと考えることができる。典型的には、本発明のバキュロウイルスにおける適切なCMVプロモーター配列は配列番号：2内に実質的な欠失を有する（例えば、少くとも25、50、100又は200ヌクレオチドの欠失削除）。適切なCMVプロモーターは、配列番号：2の配列の1つのヌクレオチドの欠失さえ含んでもよく、なお配列番号：2の配列を含まないと考えることができる。

【0010】CMVプロモーター配列は、必ずしもこれと同一である必要はないが、バキュロウイルスゲノムの関係でRNA転写を駆動することができる天然のサイトメガロウイルス由来のいずれかの配列である。非バキュ

ロウイルスRNA又はタンパク質は、天然のバキュロウイルスのゲノムによりコードされないいずれかのRNA又はタンパク質である。但し、非バキュロウイルスRNA又はタンパク質の一部はバキュロウイルス配列を含み得る。例えば、非バキュロウイルスタンパク質は、バキュロウイルスタンパク質及びヒトタンパク質から形成される融合タンパク質であり得る。非バキュロウイルスタンパク質は、検出可能なタンパク質、例えばルシフェラーゼであっても、生きている生物殺有害生物剤としてのバキュロウイルスの使用を増大させ得る昆虫毒素であってもよい。検出可能なタンパク質は、酵素、放射能、色原、蛍光、又はルミネセンス特性を示し得る。

【0011】本発明は、昆虫細胞に本発明のバキュロウイルスを感染させることにより昆虫細胞において非バキュロウイルスRNA又はタンパク質を発現する方法も含む。本発明のバキュロウイルス及び方法は、（最小CMVプロモーターにより駆動される組換えバキュロウイルスRNA又はタンパク質を含む）外来RNA及びタンパク質の生活環と独立した高レベルの発現を供する。例えば、生物殺有害生物剤をコードするRNAは、組換えバ

キュロウイルス内の配列によりコードされ得る。次にこのバキュロウイルスは、自然の感染により昆虫害虫集団を抑制するのに用いることができる。

【0012】更に、本発明は、配列番号：2の配列を含まないCMVプロモーター配列を含むプラスミドを含む。好ましくは、そのCMVプロモーターは配列番号：1の配列を含む。更に、本発明は、細胞内でタンパク質を発現させる方法であって、その細胞を、配列番号：2の配列を含まないプラスミドで形質転換することを含む方法も含む。好ましくは、本発明の方法は、その細胞を配列番号：1の配列を含むプラスミドで形質転換することを含む。

【0013】本発明の他の特徴又は利点は、以下の説明を記載から及び特許請求の範囲からも明らかになるであろう。

【0014】

【発明の実施の形態】本発明は、RNA又はタンパク質の発現を駆動する最小CMVプロモーター配列を含む新規バキュロウイルスに関する。最小CMVプロモーター配列は、全長CMV即時早期プロモーター配列から欠失した配列である配列番号：2（上述）がない機能的CMVプロモーターである。最小プロモーター配列の例は配列番号：1である（上述）。

【0015】種々の外来遺伝子要素を有するバキュロウイルスをクローニングするための標準的な方法は公知である。組換えバキュロウイルスを昆虫又はその細胞導入するための方法も公知である。例えば、Pfeiferら、Gene 188：183～190，1999；及びClemら、J. Virol. 68：6759～6762，1994を参照のこと。更に詳述しないが、当業者は、先の開示及び以下の記載に基づいて、本発明をその最も十分な程度まで利用すると信じられる。以下の例は当業者がいかに本発明を実施するかを単に実例で示すものとして解釈すべきであり、いずれにしても、本開示を限定するものではない。本開示に言及されるいずれの出版物も引用により本明細書に組み込まれる。

【0016】以下の記載に用いる実験手順並びに組換えプラスミド及びウイルスは最初に議論される。組換えオートグラフ・カリホルニカ（*Autographa californica*）多重核多角体ウイルス（AcMNPVs）を作るために、ホタルルシフェラーゼをコードするDNA及び種々のプロモーターを、完全なポリヒドリン遺伝子及び外来遺伝子発現のためのp10プロモーターを含む転移ベクターpAcUW21（PhagRMingen）にクローン化した（Roelvinkら、J. Gen. Virol 73：1481～1489，1992；Vlakら、Virology 179：312～320，1990；及びWeyerら、J. Gen. Virol 71：1525～1534，1990）。最小CMV（CMVmin）プロモーター及びTRE-CMVminプロモーターはGossenら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89：5547～5551，1992に記載される。CMVminプロモーターはC

MVプロモーターの+75～-35の間の配列を含む。TRE-CMVminプロモーターは、CMVminプロモーターに配合したTn10のオペレーター02由来の42-bp TetO配列の7つのコピーを含む（Gossenら、前掲）。ホタルルシフェラーゼ遺伝子の転写開始部位の+30から終止コドンまでを含むルシフェラーゼ遺伝子のコーディング領域（Wetら、Mol. Cell Biol. 7：725～737，1989）をCMVminプロモーターによって駆動させた。TRE-CMVminプロモーターをプラスミドpTRE-Luc（Clontech）から得てpAcUW21に別個に挿入し、このプラスミドのもとにあつたp10プロモーターを置換した。生じたプラスミドを各々pAPcML及びpAPcMLと名づけた。プラスミドpAPcMLを

に受託番号としてブタベスト条約下でChina Center For Type Culture Collection (CCTCC)に寄託した。pTRE-Lucプラスミドからのルシフェラーゼコーディング配列（位置507～2187bpからのもの、Clontech）もプラスミドpAcUW21内のAcMNPVのp10プロモーターの制御下にpAcUW21にクローン化し、生じたプラスミドをpAP10Lと名づけた。pTet-Offから得た全長CMVプロモーター（位置68～673bpから、Clontech）を、pTRE-Lucから得たルシフェラーゼコーディング領域（位置507～2186bpから、Clontech）と一緒に、p10プロモーターのかわりにpAcUW21に挿入し、生じたプラスミドをpAPcLと名づけた。

【0017】プラスミドpTet-Off（Clontech）からのトランスアクティベータータンパク質tTAのコーディング領域をp10プロモーターの制御下でpAcUW21にクローン化し、生じたプラスミドをpAP10Tと名づけた。pEGFP-1プラスミド（Clontech）からの増強される緑色蛍光タンパク質（EGFP）のコーディング配列をpAcUW21にクローン化し、p10プロモーターの制御下におき、生じたプラスミドをpAP10Eと名づけた。pAPtcmLプラスミド中のルシフェラーゼコーディング配列をEGFPコーディング配列で置換し、そのEGFPコーディング領域がTRE-CMVminプロモーターの制御下にある生じた構成物をpAPtcmEと名づけた。

【0018】プラスミドpAPcL，pAP10L，pAPcML，及びpAPtcmLにvAcRP23，LacZ（PharMingen）を同時トランスフェクトし、AcMNPVの直鎖ゲノムDNAをLipofectin（Life Technologies）を用いてSf21細胞に移入した。生じた組換えウイルスは、全長CMVプロモーター、CMVminプロモーター、TRE-CMVminプロモーター、及びp10プロモーターの制御下でルシフェラーゼ遺伝子を含んだ。

これらのウイルスの各々をvAPcL, vAPcmL, vAPtcmL、及びvAP10Lと名づけた。pAPtcmE及びpAP10EプラスミドにvAcRP23, LacZを同時トランスフェクトした。TRE-CMVminプロモーター及びp10プロモーターの制御下にEGFP遺伝子を含む生じた組換えウイルスを各々vAPtcmE及びvAP10Eと名づけた。pAP10TにvAcRP23, LacZを同時トランスフェクトし、p10プロモーターの制御下にtTA遺伝子を含む生じた組換えウイルスをvAP10Tと名づけた。これらの組換えウイルス全てを3回の終点希釈により精製し、閉塞及びルシフェラーゼの存在、EGFP、又はtTA発現により同定した。

【0019】Sf21細胞( $2 \times 10^5$ )をPBSで2回、洗い、示される時間、100mMリン酸カリウム(pH 7.8)、0.2% Triton X-100、及び2mM  $\beta$ -メルカプトエタノールを含む緩衝液(300  $\mu$ l)中に溶解した。その細胞ライゼート(50  $\mu$ l)を、25mMリン酸緩衝液(pH 7.8)、4mM EGTA、15mM  $MgSO_4$ 、1mMジチオトレイトール、及び0.2mM ATPを含む反応緩衝液(180  $\mu$ l)と共にインキュベートした。その後、50  $\mu$ lの0.2mM ルシフェリン(Promega)溶液を自動注入し、相対的光単位(RLV/10秒)を、ルミノメーター(Berthold, Lunat LB9501)を用いて測定した。結果を、3回の独立した実験の3回重複アッセイからの、平均ルシフェラーゼ活性対感染の時間としてプロットした。

【0020】Cyto Fluor 2300/2350蛍光測定システム(Millipore)を用いて可溶性EGFP蛍光を定量した。Sf21細胞( $2 \times 10^5$ )をPBS緩衝液で2回、洗い、示される時間、100mMリン酸カリウム(pH 7.8)、0.2% Triton X-100、及び2mM  $\beta$ -メルカプトエタノールを含む緩衝液(300  $\mu$ l)中に溶解した。細胞ライビート(50  $\mu$ l)を、485/20nm励起フィルター及び530/25nm放射フィルターを備えたCyto Fluorプレートソーダーを用いてEGFP蛍光検出前に96ウェルプレート(Falcon)に移した。Cyto Fluor 2300/2350蛍光測定システムは、0.1~100  $\mu$ g/mlの範囲にわたって直線的に、EGFP蛍光を定量することができた。結果を、3回の独立した実験の3回重複アッセイから、平均EGFP蛍光対感染後の時間としてプロットした。

【0021】イムノブロッティング分析のために、タンパク質を12%SDS/PAGEにより分画し、次にHyperbond C膜(Amersham)に移した。その膜を、1時間、室温で、3%非ゲイリークリーマーを含むTris緩衝塩類溶液(TTBS; 100mM Tris (pH 7.4)、100mM NaCl、及び

0.2% Tween-20)でブロックした。次にその膜を4℃で一晩、TTBS中で一次抗体(抗ルシフェラーゼ抗体(Cortex Biochem)又は抗EGFP抗体(Clontech)のいずれか)と共にインキュベートした。次に二次抗体とコンジュゲートさせたセイヨウワサビペルオキシダーゼ(HRP)をその膜に加え、次に室温で1時間、インキュベートした。HRPを、製造元により供されるプロトコルに従って、増強化学発光キット(ECL; Amersham)により検出した。

【0022】上述の手順を利用する実験結果は次の通りであった。TRESの2つの調節構成物のうちの1つであるpTRE-Luc(Clontech)を、単独で又はpTet-Off(Clontech)と組み合わせてSf21細胞にトランスフェクトした。pTRE-Lucは、TRE-CMVminプロモーターにより駆動されるルシフェラーゼコーディング領域を含み、pTet-Offは、全長CMVプロモーターにより駆動されるtTAコーディング領域を含む。両方の構成物の同時トランスフェクションは、pTRE-Luc単独のトランスフェクションに比べてわずかな活性の増強を示したが刺激のレベルは低かった。直前のプラスミドを用いる各々の実験におけるルシフェラーゼ活性は極めて弱かった。これらの結果は、全長CMVプロモーターのプロモーター活性はSf21細胞内でtTAを作り出すために極めて弱い。

【0023】Sf21細胞においてリポーティング遺伝子機能を測定することにおいてTRESを利用するために、新しいプラスミドpAP10Tを上述の通り作製してpTet-Offに置換した。全長CMVプロモーターのかわりに、p10プロモーター(Vlakら、Virology 179: 312~320, 1990; 及びWeyerら、J. Gen Virol 71: 1525~2534, 1990)を用いてtTAを駆動した。

【0024】増加量のpTRE-Luc DNAのみを細胞にトランスフェクトした場合、ルシフェラーゼ活性はかろうじて検出できた。しかしながら、種々の濃度のpAP10Tを増加濃度のpTRE-Lucと共にトランスフェクトした場合、ルシフェラーゼ活性はかなり増強された。pAP10T及びpTRE-Lucの同時トランスフェクションで、ルシフェラーゼ活性の刺激はpTRE-Lucトランスフェクションのみと比べて160倍も高かった。

【0025】昆虫細胞内のtTAによりトランスアクティベートされたルシフェラーゼはテトラサイクリンの添加により抑制され得る。テトラサイクリン感受性は0.001  $\mu$ g/mlで明らかになった。これらの実験は、TRESの刺激及び抑制はSf21細胞において極めて調節可能である。2つのTRES構成物がAcMNPVのゲノム内で機能することができるか否かを決定するために、pAP10Tを最初に、上述の通り、AcMNPV

に挿入した。組換えウイルス vAP10T を次に作った。ルシフェラーゼ活性を、tTA 発現性ウイルス vAP10T での pTRE-Luc の同時感染によって刺激した。最も大きな刺激は、vAP10T を 0.1 の m. o. i. で感染させた時に観察された。より低い (m. o. i. = 0.01) 又はより高い (m. o. i. = 1) ウイルス濃度で現れるルシフェラーゼ活性の減少は、感染した細胞の少なさ (低い m. o. i.) 又は迅速なウイルス誘導細胞死 (高い m. o. i.) の結果のようであった。

【0026】最も優れた活性化比、91 倍刺激が、0.2  $\mu$ g/ウェルの濃度で pTRE-Luc を用いることによって観察された。pTRE-Luc のトランスフェクション及び次の vAP10T の感染により与えられるルシフェラーゼ発現の刺激は、テトラサイクリンの添加によって阻害された。この阻害は、2つの対応するプラスミド構成物による同時トランスフェクションによって与えられる抑制に似た抑制速度を阻害した。

【0027】合成 TRE-CMVmin プロモーターを上記の通りバキュロウイルス転移ベクター pAcUM21 に挿入して pAPtcmL 及び組換えウイルス vAPtcmL を作り出し、生じた。予期せぬことに、ウイルスに挿入した後、ルシフェラーゼは、vAP10T での同じ感染あり又はなしで高度に発現された。テトラサイクリンでの更なる処理はルシフェラーゼ発現を抑制せず、このことは、vAPtcmL からのルシフェラーゼの発現は、テトラサイクリン応答性発現メカニズムによって活性化されないことを示唆する。

【0028】TRE-CMVmin プロモーター含有ウイルス中での強力なルシフェラーゼ発現のメカニズムを検査するために、いくつかのプロモーターを作製してそれらが tTA 刺激なしでルシフェラーゼ遺伝子を活性化する能力を決定した。これらのプロモーターは全長 CMV プロモーター (pAPcL 内)、AcMNPV の p10 プロモーター (pAP10L 内)、CMVmin プロモーター (pAPtcmL 内) であった。全てのプロモーターを、AcMNPV のポリヒドリン遺伝子に隣接する側面フラグメントを含むプラスミドである pAcUW21 に挿入した。これら 4つの構成物に加えて、pTRE-Luc (Clontech) を対照として用いた。

【0029】pAPcL はトランスフェクションのみ又は活性型 AcMNPV の同時感染のいずれかによりプロモーター活性を示さなかった。第2の構成物である pAP10L も、いずれの条件下でもプロモーター活性を示さなかった。これは、p10 プロモーターは他のウイルス産物の発現を要求する強力な後期プロモーターであるからである。第3及び第4の構成物である pAPcmL 及び pAPtcmL は、単独でトランスフェクトした時に極めて低いプロモーター活性しか示さなかったが、対応する組換えウイルスを同時感染に用いた時に強力に刺

激された。これらの結果は、CMVmin プロモーターは、TRE 要素あり又はなしでウイルス因子により強力に刺激されることを示唆する。しかしながら、全長 CMV プロモーターは用いるいずれの条件下でも昆虫細胞内で発現されなかった。

【0030】全長 CMV, TRE-CMVmin, CMVmin、及び p10 プロモーターを含む転移ベクタープラスミドを用いて組換え AcMNPV: vAPcL, vAPtcmL, vAPcmL、及び vAP10L を各々作製した。異なるプロモーターを含む独立して単離された組換えウイルス株のいくつかのグループの活性を、10 の m. o. i. で感染後 72 時間にテストした。全部で 3つの vAPcLs のルシフェラーゼ活性は低く、1.6 ~ 2.0  $\times 10^4$  RLV/ $\mu$ g タンパク質の範囲であったが、他のプロモーターを含む他の組換えバキュロウイルスの活性は高かった。全部で 3つの組換え vAPtcmL のルシフェラーゼ活性は 3.5 ~ 3.7  $\times 10^6$  RLV/ $\mu$ g タンパク質の範囲であった。全部で 4つの組換え vAP10T は、6.5 ~ 7.7  $\times 10^6$  RLV/ $\mu$ g タンパク質の範囲であった。これらの結果は、全長 CMV プロモーターの活性は、CMVmin プロモーター含有ウイルスのそれより約 200 倍低いことを示した。

【0031】CMVmin プロモーター含有ウイルスは、ルシフェラーゼ活性を、p10 プロモーターにより発現されるものに近いレベルまで誘導した。更に、これらの結果は、CMVmin プロモーターが示す高いプロモーター活性が CMVmin プロモーター含有組換えウイルス単離物のいくつかに限られないことを示唆する。従って、各々のプロモーター構成物中の 1つの組換えウイルスを選択し、プロモーター発現の時間経過研究を行った。

【0032】異なるプロモーターを有する組換えウイルスにおけるプロモーター発現の時間経過を、2つの検出可能なタンパク質：ルシフェラーゼ及び EGFP の発現を検査することにより研究した。両タンパク質の活性を、CMVmin プロモーターを含む組換えウイルスの感染後 4 時間に、最初に検出した (ルシフェラーゼのために vAPtcmL 及び vAPcmL、並びに EGFP のために vAPcmE)。これらのウイルスのルシフェラーゼ及び EGFP 活性は、後に顕著に増加し、各々感染後 48 時間及び 36 時間に安定水準に達した。全長 CMV プロモーターを含むウイルス vAPcL は vAPtcmL 及び vAPcmL ウイルスより約 200 倍少くルシフェラーゼを発現し、このことは、全長 CMV プロモーターは AcMNPV のゲノム内で弱い機能しか有さないことを示唆する。

【0033】p10 プロモーターを含む組換えウイルス vAP10L は、直前に記載したウイルスと異なる挙動をした。p10 プロモーターを介して発現されたルシフ



ェラーゼ及びEGFPの活性を感染後8時間に検出し、それは感染後48時間又はその後に安定状態に達した。  
p10プロモーター含有ウイルスにより発現される最大ルシフェラーゼ及びEGFP活性はCMVminプロモーター含有ウイルスにより発現されるより約2倍（ルシフェラーゼ）及び16倍（EGFP）高かった。後者は、ルシフェラーゼ又はEGFPを感染後より早期に発現した。

【0034】CMVminプロモーター含有ウイルスにより発現されるルシフェラーゼは、感染後最初の36時間の間、vAP10Lのものより大きかった。この期間の間、CMVmin-駆動発現がp10駆動発現より12時間、早くおこったことを除いて、CMVminプロモーター含有ウイルスはp10プロモーター含有ウイルスによって発現された。

【0035】ウェスタン・プロット分析は、CMVminプロモーター駆動ウイルスvAPcml及びvAPtcmeから発現されたルシフェラーゼ及びEGFPのた

めの最初の検出時間は、感染後12時間に観察されることを示した。対照的に、p10プロモーター駆動ウイルスvAP10L及びvAP10Eからの発現は、感染後24時間に観察された。感染後36時間に、p10及びCMVminプロモーター駆動ウイルスは同様の量のそれらの各々の検出可能なタンパク質を発現し始めた。感染後72時間に、CMVmin駆動の発現のp10駆動発現に対する比率はルシフェラーゼについて1:1.9及びEGFPについて1:3であった。

【0036】これらの実験結果は、まとめて、全長のCMVプロモーターは昆虫細胞内又はバキュロウイルスのゲノム内で機能的でないことを示した。しかしながら、驚くことに、CMVminプロモーターはウイルス同時感染により送り出されるなら、昆虫細胞内で強力に機能する。

【0037】

【配列表】

#### SEQUENCE LISTING

```
<110> Academia Sinica
<120> Baculovirus containing minimal CMV promotor
<130> A996400
<140> JP 2000-035693
<141> 2000-2-8
<160> 2
<210> 1
<211> 111
<212> DNA
<213> cytomegalovirus
<400> 1
taggcgtgta cggtagggagg tctatataag cagagctcgt ttagtgaacc gtcagatcac 60
tagaagcttt attgcggttag ttatcacag ttaaattgct aacgcagtca g 111
<210> 2
<211>
<212> DNA
<213> cytomegalovirus
<400> 2
tcaatattgg ccattagcca tattattcat tggttatata gcataaatca atattggcta 60
ttggccattg catacgttgt atctatatca taatatgtac atttatattg gtcctatgtcc 120
aatatgaccg ccattgttggc attgattatt gactagtatt taatagtaat caattacggg 180
gtcattagtt catagcccat atatggagtt ccgcgttaca taacttacgg taaatggccc 240
gcctggctga ccgcccaacg acccccgccc attgacgtca ataataacgt atgttcccat 300
agtaacgcca atagggactt tcattgacg tcaatgggtg gattatttac ggtaaacgtc 360
ccacttgcca gtacatcaag tgtatcatat gccaaagtcg cccctattg acgtcaatga 420
cggtaaatgg cccgcctggc attatgccca gtacatgacc ttacgggact ttcctacttg 480
gcagtacatc tacgtattag tcatcgctat tacatgggtg atgcggtttt ggagctacac 540
caatgggcgt ggatagcggt ttgactcacg gggatttcca agtctccacc ccattgacgt 600
caatgggagt ttgttttggc accaaaatca acgggacttt ccaaaatgtc gtaataaccc 660
cgccccgttg acgcaaatgg gcgg 684
```

【手続補正書】

【提出日】平成12年4月26日(2000. 4. 26)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0016

【補正方法】変更

【補正内容】

【0016】以下の記載に用いる実験手順並びに組換えプラスミド及びウイルスは最初に議論される。組換えオートグラフ・カリホルニカ(*Autographa californica*)多重核多角体ウイルス(AcMNPVs)を作るために、ホタルルシフェラーゼをコードするDNA及び種々のプロモーターを、完全なポリヒドリン遺伝子及び外来遺伝子発現のためのp10プロモーターを含む転移ベクターpAcUW21(PhagRMingen)にクローン化した(Roelvinkら, J. Gen. Virol 73: 1481~1489, 1992; Vlakら, Virology 179: 312~320, 1990; 及び Weyerら, J. Gen. Virol 71: 1525~1534, 1990)。最小CMV(CMVmin)プロモーター及びTRE-CMVminプロモーターはGossenら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 5547~5551, 1992に記載される。CMVminプロモーターはCMVプロモーターの+75~-35の間の配列を含む。TRE-CMVminプロモーターは、CMVminプロモーターに配合したTn10のオペレーター02由来

の42-bp TetO配列の7つのコピーを含む(Gossenら, 前掲)。ホタルルシフェラーゼ遺伝子の転写開始部位の+30から終止コドンまでを含むルシフェラーゼ遺伝子のコーディング領域(Wetら, Mol. Cell Biol. 7: 725~737, 1989)をCMVminプロモーターによって駆動させた。TRE-CMVminプロモーターをプラスミドpTRE-Luc(Clontech)から得てpAcUW21に別個に挿入し、このプラスミドのもとにあったp10プロモーターを置換した。生じたプラスミドを各々pAPcML及びpAPcMLと名づけた。プラスミドpAPcMLを2000年1月21日に受託番号CCTCC200003としてブタベスト条約下でChina Center For Type Culture Collection(CCTCC)に寄託した。pTRE-Lucプラスミドからのルシフェラーゼコーディング配列(位置507~2187bpからのもの、Clontech)もプラスミドpAcUW21内のAcMNPVのp10プロモーターの制御下にpAcUW21にクローン化し、生じたプラスミドをpAP10Lと名づけた。pTet-Offから得た全長CMVプロモーター(位置68~673bpから、Clontech)を、pTRE-Lucから得たルシフェラーゼコーディング領域(位置507~2186bpから、Clontech)と一緒に、p10プロモーターのかわりにpAcUW21に挿入し、生じたプラスミドをpAPcLと名づけた。

フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テーマコード(参考)
//(C12N 15/09	ZNA	C12R 1:92)	
C12R 1:92)		1:91)	
(C12N 1/00		(C12N 9/02	
C12R 1:92)		C12R 1:91)	
(C12N 5/10		C12N 15/00	ZNAA
C12R 1:91)		5/00	B
(C12N 9/02		C12R 1:92)	
C12R 1:91)		1:91)	

Fターム(参考) 4B024 AA20 BA08 CA11 CA12 DA02  
EA02 FA02 GA11 HA01  
4B050 CC03 DD11 LL03 LL10  
4B065 AA90X AA95Y AB01 BA02  
CA28 CA46

1. Title of Invention

**BACULOVIRUS CONTAINING MINIMAL CMV PROMOTER**

2. Detailed Description of Invention

**Background of the present invention**

The baculoviruses are a family of DNA viruses which primarily infect insects of the order Lepidoptera. Baculovirus genomes are double-stranded DNA molecules, generally about 80-230 kb in length.

Baculoviruses are able to express large quantities of non-baculovirus proteins driven by the endogenous polyhedrin and *p10* promoters, both of which are strongly active during the late stage of the virus life cycle. However, for some proteins, expression earlier in the baculovirus life cycle may be appropriate and preferred. For example, it may be desirable to drive expression of a glycoprotein earlier in the virus life cycle since, by the late stage of the virus life cycle, post-translational glycosylation is at least somewhat impaired.

**Summary of the present invention**

The invention is based on the discovery that a minimal cytomegalovirus (CMV) immediate-early promoter can efficiently drive expression of a gene in a baculovirus vector. Because the CMV promoter is not regulated through the virus life cycle, this discovery allows the construction of baculovirus vectors capable of high-level expression of a RNA or protein in the early stage, as well as the late stage, of the virus life cycle.

Accordingly, the invention features a baculovirus having a genome which includes a CMV promoter sequence and a sequence encoding an RNA (e.g., a non-baculovirus RNA). The expression of the RNA (e.g., a mRNA encoding a non-baculovirus protein) is driven by a minimal CMV promoter sequence (e.g., SEQ ID NO:1). Examples of minimal CMV promoter sequences include those that are free of SEQ ID NO:2, an upstream sequence often included in full-length CMV promoter sequences

but absent in minimal CMV promoter sequences. These sequences are shown below.

A CMV minimal promoter sequence:

taggcgtgtacggggagggtctatataagcagagctcgttagtgtaaccgtcagatcac  
tagaagcmtatgcggtagmtatcacagttaattgctaacgcagtcag  
(SEQ ID NO:1)

A sequence deleted from a full length CMV promoter:

tcaatattggccattagccatattatcattggttatatagcataaatcaatattggcta  
ttggccattgcatacgtgtatctatataatattgacatttatattggctcatgtcc  
aatatgaccccatgttggcattgatttactagttattaatagtaataaattacggg  
gtcattagtcatagcccatatattggagtccgcgttacataactacggtaaatggccc  
gcctggctgaccgcccacgacccccgccattgacgtcaataatgacgtatgttccat  
agtaacgccaatagggaacttccattgacgtaaatgggtggagtatttaccgtaaatgc  
ccacttggcagtacatcaagtgtatcatatgccaaagtcgccccctattgacgtcaatga  
cggtaaatggcccgcttggcattatgccagtcacgttacgggacttccctacttg  
gcaglacatctacgtattagtcacgtattaccatggtgatgcggttttggcagtacac  
caatgggcgtgtagcgggttgactcacgggattccaagtctcacccttggcgt  
caatgggagttgtttggcaccaaaatcaacgggacttccaaaatgtcgtataaaccc  
cgccccgttgacgcaaatggcg (SEQ ID NO:2)

In the naturally occurring CMV genome, the CMV minimal promoter sequence (SEQ ID NO:1) is immediately downstream of the sequence deleted from the full length CMV promoter sequence (SEQ ID NO:2).

When a CMV promoter sequence is said to be free of SEQ ID NO:2, it means that the promoter sequence does not contain the complete nucleotide sequence of SEQ ID NO:2. Thus, the promoter sequence can contain a

fragment of SEQ ID NO:2 and still be considered free of SEQ ID NO:2. Typically, a suitable CMV promoter sequence in the baculoviruses of the invention has a substantial deletion within SEQ ID NO:2 (e.g., at least 25, 50, 100, or 200 nucleotides deleted). Suitable CMV promoters can even contain a single nucleotide deletion of SEQ ID NO:2 and still be considered free of SEQ ID NO:2.

A CMV promoter sequence is any sequence derived from, but not necessarily identical to, a naturally occurring cytomegalovirus which is capable of driving RNA transcription in the context of a baculovirus genome. A non-baculovirus RNA or protein is any RNA or protein which is not encoded by the genome of a naturally occurring baculovirus, although a portion of a non-baculovirus RNA or protein can include a baculovirus sequence. For example, the non-baculovirus protein can be a fusion protein formed from a baculovirus protein and a human protein. The non-baculovirus protein can also be a detectable protein, such as luciferase, or an insect toxin that can augment the use of a baculovirus as a live biopesticide. Detectable proteins can exhibit enzymatic, radioactive, chromogenic, fluorescent, or luminescent properties.

The invention also includes a method of expressing a non-baculovirus RNA or protein in an insect cell by infecting the insect cell with a baculovirus of the invention.

The baculoviruses and methods of the invention provide life-cycle independent, high level expression of foreign RNAs and proteins (including recombinant baculovirus RNAs or proteins which are driven by a minimal CMV promoter). For example, an RNA encoding a biopesticide protein can be encoded by a sequence in a recombinant baculovirus. This baculovirus can then be used to control insect pest populations by natural infection.

Furthermore, the present invention includes a plasmid comprising a

CMV promoter sequence which is free of SEQ ID NO: 2. Preferably, said CMV promoter comprises SEQ ID NO: 1.

Additionally, the present invention also includes a method of expressing a protein in a cell, which comprises transforming the cell with the plasmid which is free of SEQ ID NO: 2. Preferably, the method of the invention comprises transforming the cell with the plasmid which comprises SEQ ID NO: 1.

Other features or advantages of the present invention will be apparent from the following detailed description, and also from the claims.

#### Detailed Description of the Invention

The invention relates to a new baculovirus containing a minimal CMV promoter sequence which drives expression of an RNA or a protein. A minimal CMV promoter sequence is a functional CMV promoter that is free of SEQ ID NO:2 (see above), which is a sequence deleted from the full CMV immediate-early promoter sequence. An example of a minimal promoter sequence is SEQ ID NO:1 (see above).

Standard procedures for cloning baculoviruses having various foreign genetic elements are well known in the art. Procedures for introducing recombinant baculoviruses into insects or cells thereof are also well known. See, e.g., Pfeifer et al., *Gene* 188:183-190, 1997; and Clem et al., *J Virol* 68:6759-6762, 1994.

Without further elaboration, it is believed that one skilled in the art can, based on the above disclosure and the description below, utilize the present invention to its fullest extent. The following example is to be construed as merely illustrative of how one skilled in the art can practice the invention and are not limitative of the remainder of the disclosure in any way. Any publications cited in this disclosure are hereby incorporated by reference.

The experimental procedures and recombinant plasmids and viruses

used in the description below are first discussed.

To generate recombinant *Autographa californica* multiple nuclear polyhedrosis viruses (AcMNPVs), DNA encoding firefly luciferase and various promoters were cloned into the transfer vector pAcUW21 (PharMingen) which contains a complete polyhedrin gene and a *p10* promoter for foreign gene expression (Roelvink et al., J Gen Virol 73:1481-1489, 1992; Vlak et al., Virology 179:312-320, 1990; and Weyer et al., J Gen Virol 71:1525-1534, 1990). The minimal CMV (CMVmin) promoter and TRE-CMVmin promoter are described in Gossen et al., Proc Natl Acad Sci USA 89:5547-5551, 1992. The CMVmin promoter encompasses the sequence between +75 and -53 of the CMV promoter. The TRE-CMVmin promoter contains seven copies of the 42-bp *ret0* sequence derived from operator *O2* of *Tn10* fused to the CMVmin promoter (Gossen et al., supra). The coding region of a luciferase gene, encompassing +30 of the transcription start site to the stop codon of firefly luciferase gene (Wet et al., Mol Cell Biol 7:725-737, 1987), was driven by a CMVmin promoter. A TRE-CMVmin promoter was derived from plasmid pTRE-Luc (ClonTech) and separately inserted into pAcUW21 to replace the *p10* promoter originally located in this plasmid. The resulting plasmids were named pAPcmL and pAPtcmL, respectively. The plasmid pAPcmL was deposited with China Center For Type Culture Collection (CCTCC) under the Budapest Treaty under accession number \_\_\_\_\_ on \_\_\_\_\_. The luciferase coding sequence from the pTRE-Luc plasmid (from position 507 to 2187 bp, ClonTech) was also cloned into pAcUW21 under the control of the *p10* promoter of AcMNPV in the plasmid pAcUW21, and the resulting plasmid was named pAP10L. The full-length CMV promoter derived from pTet-Off (from position 68 to 673 bp, ClonTech) together with the luciferase coding region derived from pTRE-Luc (from position 507 to 2187 bp, ClonTech), were inserted into pAcUW21 in place of the *p10* promoter, and the resulting plasmid was named pAPcL.

The coding region of the transactivator protein tTA from plasmid pTet-

Off (ClonTech) was cloned into pAcUW21 under control of the *p10* promoter, and the resulting plasmid was named pAP10T. The coding sequence of the enhanced green fluorescent protein (EGFP) from the pEGFP-1 plasmid (ClonTech) was cloned into pAcUW21 and placed under the control of the *p10* promoter, and the resulting plasmid was named pAP10E. The luciferase coding sequence in the pAPtcmL plasmid was replaced with the EGFP coding sequence, and the resulting construct, in which the EGFP coding region was placed under the control of TRE-CMVmin promoter, was named pAPtcmE.

Plasmids pAPcL, pAP10L, pAPcml, and pAPtcmL were cotransfected with vAcRP23.LacZ (PharMingen), a linearized genomic DNA of AcMNPV, into Sf21 cells using Lipofectin (Life Technologies). The resultant recombinant viruses contained a luciferase gene under the control of a full-length CMV promoter, a CMVmin promoter, a TRE-CMVmin promoter, and a *p10* promoter. Each of these viruses were named vAPcL, vAPcml, vAPtcmL, and vAP10L, respectively. The pAPtcmE and pAP10E plasmids were cotransfected with vAcRP23.LacZ. The resultant recombinant viruses containing the EGFP gene under the control of the TRE-CMVmin promoter and the *p10* promoter were named vAPtcmE and vAP10E, respectively. The pAP10T was cotransfected with vAcRP23.LacZ, and the resultant recombinant virus containing the rTA gene under control of the *p10* promoter was named vAP10T. All of these recombinant viruses were purified by three rounds of end point dilution and identified both by the presence of occlusions and luciferase, EGFP, or rTA expression.

Sf21 cells ( $2 \times 10^5$ ) were washed twice with PBS and lysed for the indicated time in buffer (300  $\mu$ l) containing 100 mM potassium phosphate (pH 7.8), 0.2% Triton X-100, and 2 mM  $\beta$ -mercaptoethanol. The cell lysate (50  $\mu$ l) was incubated with reaction buffer (180  $\mu$ l) containing 25 mM phosphate buffer (pH 7.8), 4 mM EGTA, 15 mM  $\text{MgSO}_4$ , 1 mM



dithiothreitol, and 0.2 mM ATP. Afterwards, 50  $\mu$ l of 0.2 mM luciferin (Promega) solution was auto-injected, and relative light units (RLU/10 seconds) were measured using a luminometer (Berthold, Lumat LB 9501). The results were plotted as the average luciferase activities versus time of infection from triplicate assays of three independent experiments.

A CytoFluor 2300/2350 fluorescence measurement system (Millipore) was used to quantify soluble EGFP fluorescence. Sf21 cells ( $2 \times 10^5$ ) were twice washed with PBS buffer and lysed for the indicated times in buffer (300  $\mu$ l) containing 100 mM potassium phosphate (pH 7.8), 0.2% Triton X-100, and 2 mM  $\beta$ -mercaptoethanol. Cell lysates (50  $\mu$ l) were transferred to 96-well plates (Falcon) prior to EGFP fluorescence detection using a CytoFluor plate reader equipped with a 485/20 nm excitation filter and a 530/25 nm emission filter. The CytoFluor 2300/2350 fluorescence measurement system could quantify EGFP fluorescence linearly over a range of 0.1 to 100  $\mu$ g/ml. The results were plotted as the average EGFP fluorescence versus time after infection, from triplicate assays of three independent experiments.

For immunoblotting analysis, proteins were fractionated by 12% SDS/PAGE and then transferred to a Hyperbond C membrane (Amersham). The membrane was blocked with Tris-buffer saline (TTBS; 100 mM Tris (pH 7.4), 100 mM NaCl, and 0.2% Tween-20) containing 3% non-dairy creamer at room temperature for one hour. The membrane was then incubated with primary antibody (either anti-luciferase antibody [Cortex Biochem] or anti-EGFP antibody [ClonTech]) in TTBS overnight at 4 °C. Horseradish peroxidase (HRP) - conjugated secondary antibody was then added to the membrane, which was then incubated for one hour at room temperature. HRP was detected by an enhanced chemiluminescence kit (ECL; Amersham) following the protocol provided by the manufacturer.

The experimental results utilizing the above procedures were as follows.

pTRE-Luc (ClonTech), one of the two regulatory components of TRES, was transfected alone or in combination with pTet-Off (ClonTech) into Sf21 cells. pTRE-Luc contains a luciferase coding region driven by the TRE-CMV<sub>min</sub> promoter, and pTet-Off contains a tTA coding region which is driven by the full-length CMV promoter. Although the cotransfection of both components showed a slight enhancement of activity comparing to the transfection of pTRE-Luc alone, levels of stimulation were low. The luciferase activity in each experiment using the plasmids immediately above were extremely weak. These results showed that the promoter activity of full-length CMV promoter is extremely weak for producing tTA in Sf21 cells.

To utilize TRES in measuring reporting gene function in Sf21 cells, a new plasmid pAP10T was constructed as described above to replace pTet-Off. Instead of the full-length CMV promoter, a *p10* promoter (Vlak et al., Virology 179:312-320, 1990; and Weyer et al., J Gen Virol 71:1525-2534, 1990) was used to drive tTA.

When increasing amounts of pTRE-Luc DNA alone were transfected into cells, luciferase activity was barely detectable. However, when various concentrations of pAP10T were cotransfected with increasing concentrations of pTRE-Luc, luciferase activity was significantly enhanced. With cotransfection of pAP10T and pTRE-Luc, the stimulation of luciferase activity was as high as 160-fold compared with pTRE-Luc transfection alone.

Luciferase activity transactivated by tTA in insect cells may have been suppressed by addition of tetracycline. Tetracycline sensitivity was evident at 0.001  $\mu\text{g/ml}$ . These experiments suggest that stimulation and suppression of the TRES is highly controllable in Sf21 cells.

To determine whether the two TRES components could function in the genome of AcMNPV, pAP10T was first inserted into AcMNPV as

described above. A recombinant virus, vAP10T, was subsequently produced. Luciferase activity was stimulated by coinfection of pTRE-Luc with the tTA-expressing virus, vAP10T. The greatest stimulation was observed when vAP10T was infected at an m.o.i. of 0.1. The reduced luciferase activity appearing at lower (m.o.i. = 0.01) or higher (m.o.i. = 1) viral concentrations were likely the results of either fewer cells being infected (lower m.o.i.) or rapid virus-induced cell death (higher m.o.i.).

The best activation ratio, a 91-fold stimulation, was observed by using pTRE-Luc at a concentration of 0.2  $\mu$ g/well. The stimulation of luciferase expression, conferred by transfection of pTRE-Luc and subsequent infection with vAP10T, was inhibited by the addition of tetracycline. This inhibition exhibited repression kinetics similar to the repression conferred by the cotransfection by the two corresponding plasmid components.

The synthetic TRE-CMVmin promoter was inserted into the baculovirus transfer vector pAcUM21 as described above to yield pAPtcmL and the resulting recombinant virus vAPtcmL. Unexpectedly, once inserted into the virus, the luciferase was highly expressed with or without coinfection with vAP10T. Further treatment with tetracycline did not repress luciferase expression, suggesting that expression of luciferase from vAPtcmL is not activated by the tetracycline responsive expression mechanism.

To examine the mechanism of strong luciferase expression in the TRE-CMVmin promoter-containing virus, several promoters were constructed to determine their ability to activate the luciferase gene without tTA stimulation. These promoters were the full-length CMV promoter (in pAPcL), the *p10* promoter of AcMNPV (in pAP10L), the CMVmin promoter (in pAPtcmL). All promoters were inserted into pAcUW21, a plasmid containing lateral fragments flanking the polyhedrin gene of AcMNPV. In addition to these four constructs, pTRE-Luc (ClonTech) was used as a control.

pAPcL exhibited no promoter activity by either transfection alone or coinfection of wild type AcMNPV. The second construct, pAP10L, also exhibited no promoter activity under either condition, probably because the *p10* promoter is a strong late viral promoter which requires the expression of other viral products. The third and fourth constructs, pAPcmL and pAPtcmL, had exhibited only very low promoter activity when transfected alone, but were strongly stimulated when the corresponding recombinant virus was used in coinfections. These results suggest that the CMVmin promoter, with or without a TRE element, is strongly stimulated by viral factors. However, the full-length CMV promoter was not expressed in insect cells under any condition used.

Transfer vector plasmids containing full-length CMV, TRE-CMVmin, CMVmin, and *p10* promoters were used to construct recombinant AcMNPVs: vAPcL, vAPtcmL, vAPcmL, and vAP10L, respectively. The activity of several groups of independently isolated recombinant virus strains containing different promoters were tested at 72 hours post-infection at an m.o.i. of 10. The luciferase activity of all three vAPcLs was low, ranging between  $1.6 - 2.0 \times 10^4$  RLU/ $\mu$ g protein, whereas the activity of the other recombinant baculoviruses containing other promoters was high. Luciferase activity of all three recombinant vAPtcmLs ranged between  $3.5 - 3.7 \times 10^6$  RLU/ $\mu$ g protein. All four recombinant vAP10Ts ranged between  $6.5 - 7.7 \times 10^6$  RLU/ $\mu$ g protein. These results showed that the activity of the full-length CMV promoter is approximately 200-fold lower than that of the CMVmin promoter-containing viruses.

The CMVmin promoter-containing viruses induced luciferase activity to a level similar to that expressed by the *p10* promoter. Further, these results suggest that the higher promoter activity exhibited by the CMVmin promoter are not limited to only some of the CMVmin promoter-containing recombinant viral isolates. Accordingly, one recombinant virus in each promoter construct was selected, and time course studies of promoter

expression were performed.

The time course of promoter expression in recombinant viruses carrying different promoters was studied by examining expression of two detectable proteins: luciferase and EGFP. The activity of both proteins was first detected at 4 hours post-infection for recombinant viruses containing the CMVmin promoter (viruses vAPcmL and vAPcmL for luciferase, and vAPcmE for EGFP). The luciferase and EGFP activities of these viruses increased noticeably at later times and plateaued at 48 hours and 36 hours post-infection, respectively. Virus vAPcL, which contains the full-length CMV promoter, expressed luciferase approximately 200-fold less than did the vAPcmL and vAPcmL viruses, an indication that the full-length CMV promoter is only weakly functional in the genome of AcMNPV.

The recombinant virus vAP10L, which contained the *p10* promoter, behaved differently than the viruses described immediately above. The activity of the luciferase and EGFP expressed via the *p10* promoter were first detected at 8 hours post-infection and reached a plateau at 48 hours post-infection or later. Although the maximal luciferase and EGFP activity expressed by the *p10* promoter-containing viruses was about 2-fold (luciferase) and 16 fold higher (EGFP) than those expressed by the CMVmin promoter-containing viruses, the latter expressed luciferase or EGFP much earlier after infection.

The luciferase expressed by the CMVmin promoter-containing viruses was greater than that of vAP10L during the first 36 hours after infection. During this period, the CMVmin promoter-containing viruses expressed by the *p10* promoter-containing viruses, except that CMVmin-driven expression occurred 12 hours earlier than *p10*-driven expression.

Western blot analyses revealed that the initial detection time for luciferase and EGFP expressed from the CMVmin promoter-driven viruses

vAPcmL and vAPcmE was observed at 12 hours post-infection. In contrast, expression from *p10* promoter-driven viruses vAP10L and vAP10E was observed at 24 hours post-infection. At 36 hours post-infection, the *p10* and CMVmin promoter-driven viruses began to express similar amounts of their respective detectable proteins. At 72 hours post-infection, the ratio of CMVmin-driven expression to *p10*-driven expression was 1:1.9 for luciferase and 1:3 for EGFP.

These experiments collectively showed that the full-length CMV promoter is not functional in insect cells or in the genome of the baculovirus. However and surprisingly, the CMVmin promoter operates strongly in insect cells if delivered by viral coinfection.

### 3. Claims

1. A baculovirus comprising a genomic DNA molecule which comprises a CMV promoter sequence and a sequence encoding an RNA, the expression of the RNA being driven by the CMV promoter sequence, wherein the CMV promoter sequence comprises SEQ ID NO:1 or the functionally equivalent thereof.

2. The baculovirus of claim 1, wherein the CMV promoter sequence is SEQ ID NO:1.

3. The baculovirus of claim 2, wherein the RNA is a non-baculovirus RNA.

4. The baculovirus of claim 3, wherein the RNA is a mRNA encoding a non-baculovirus protein.

5. The baculovirus of claim 4, wherein the protein is detectable.

6. The baculovirus of claim 5, wherein the protein is luciferase.

7. The baculovirus of claim 1, wherein the RNA is a non-baculovirus RNA.

8. The baculovirus of claim 7, wherein the RNA is a mRNA encoding a non-baculovirus protein.

9. The baculovirus of claim 8, wherein the protein is detectable.

10. The baculovirus of claim 9, wherein the protein is luciferase.

11. The baculovirus of claim 1, wherein the RNA is a mRNA

encoding a non-baculovirus protein.

12. The baculovirus of claim 11, wherein the protein is detectable.
13. The baculovirus of claim 12, wherein the protein is luciferase.
14. A method of expressing an RNA in an insect cell, the method comprising infecting the insect cell with the baculovirus of claim 1.
15. A method of expressing a non-baculovirus protein in an insect cell, the method comprising infecting the insect cell with the baculovirus of claim 2.
16. A method of expressing an RNA in an insect cell, the method comprising infecting the insect cell with the baculovirus of claim 3.
17. A method of expressing a non-baculovirus protein in an insect cell, the method comprising infecting the insect cell with the baculovirus of claim 4.
18. A method of expressing an RNA in an insect cell, the method comprising infecting the insect cell with the baculovirus of claim 6.
19. A method of expressing a non-baculovirus protein in an insect cell, the method comprising infecting the insect cell with the baculovirus of claim 7.
20. A method of expressing an RNA in an insect cell, the method comprising infecting the insect cell with the baculovirus of claim 11.
21. A plasmid comprising a CMV promoter sequence which comprises SEQ ID NO: 1 or the functionally equivalent thereof.



22. The plasmid of claim 21, wherein the CMV promoter sequence is SEQ ID NO: 1.

23. The plasmid of claim 21, which further comprises a sequence encoding an protein wherein the expression of said sequence can be enhanced by said CMV promoter.

24. The plasmid of claim 21, wherein the protein is luciferase.

25. A method of expressing a protein in an cell, which comprises transforming the cell with the plasmid of claim 21.

26. A method of expressing a protein in an cell, which comprising transforming the cell with the plasmid of claim 22.

27. The method of claim 25 or 26, wherein the cell is an insect cell.

28. The method of claim 25 or 26, wherein the protein is luciferase.

1. Abstract

The present invention discloses a baculovirus having a genomic DNA molecule which includes a CMV immediately-early promoter sequence and a sequence encoding an RNA. The expression of the RNA is driven by the CMV promoter sequence, which is free of certain sequences present in the full-length CMV promoter sequence. The invention also discloses a plasmid comprising the CMV promoter sequence which is free of certain sequences present in the full-length CMV promoter sequence.

2. Representative Drawing

none